

LA FRUCTOKINASE DU FOIE

par

H. G. HERS*

*Laboratoire de Chimie Physiologique, Université de
Louvain (Belgique)*

Plusieurs travaux récents ont établi que la phosphorylation du fructose aux dépens de l'ATP** dans les extraits hépatiques est l'oeuvre d'un enzyme inactif sur le glucose^{1,2} et les autres aldohexoses, mais capable de phosphoryler les cétohexoses: fructose, sorbose, tagatose (LEUTHARDT ET TESTA^{3,4}). Le produit de la réaction semble être le fructose-1-phosphate^{1,3,4}.

D'autre part HERS, BERTHET, BERTHET ET DE DUVE⁵ ont montré que la plupart des phosphatases peuvent être écartées des homogénéisats de foie, en même temps que les organites intracellulaires, par une centrifugation prolongée à haute vitesse; le liquide surnageant phosphoryle le fructose et le glucose aux dépens de l'ATP et l'absence de phosphatases rend la réaction très régulière. L'élimination des éléments particuliers peut également se faire par agglutination à p_H 5, suivie de centrifugation à basse vitesse; les extraits obtenus de la sorte phosphorylent encore le fructose mais non le glucose. D'une façon générale, l'activité glucokinase des extraits de foie est très labile. La fructokinase par contre a pu être partiellement purifiée selon une méthode qui sera décrite ici. Nous avons étudié les diverses propriétés de l'enzyme purifié et isolé le produit de la réaction.

TECHNIQUE EXPERIMENTALE

Les mesures d'activité fructokinase sont réalisées à 38° et à p_H 7.5 dans un volume total de 1.6 ml contenant 1 mg d'hexose, 10 μM d'ATP, 10 μM de $MgCl_2$ et de l'acétate de K^+ M , ce dernier étant nécessaire pour une activité optima. Les modifications éventuelles sont indiquées dans le texte. Au cours de la purification de la fructokinase, tous les essais enzymatiques sont réalisés en présence de NaF 0.056 M ; il importe dans ce cas d'ajouter l'ATP au mélange avant le magnésium. Lorsque l'acétate M est omis, nous utilisons soit un tampon au cacodylate de sodium⁶, soit un mélange en quantités équivalentes d'acétate de sodium, de cacodylate de sodium et de borax, amené au p_H désiré par addition d'HCl (Tampon ABC⁷). Il a été vérifié que ces tampons n'exercent aucune inhibition sur l'enzyme.

La quantité d'hexoses-phosphates formés est mesurée par différence entre les hexoses libres présents au début et à la fin de la réaction, les hexoses-phosphates étant adsorbés en même temps que les protéines par un mélange en quantités équivalentes de $Ba(OH)_2$ et de $ZnSO_4$, selon WEICHSELBAUM ET SOMOGYI⁸.

* Chargé de recherche FNRS

** Adénosine triphosphate

Un certain nombre de mesures ont été faites avec l'appareil de Warburg par la technique manométrique de COLOWICK ET KALCKAR⁹ en présence de NaHCO_3 $2 \cdot 10^{-2}$ M, la phase gazeuse contenant 95% de N_2 et 5% de CO_2 . L'acétate de K^+ était alors remplacé par du KCl.

Nous avons utilisé le D-glucose, le D-mannose et le L-sorbose (HOFFMAN-LAROCHE), le D-fructose (PFANSTIEHL), et le D-galactose (RIEDEL ET DE HAEN). Le fructose-6-phosphate a été préparé à partir de fructose-diphosphate commercial (SCHWARTZ) selon la méthode décrite par NEUBERG, LUSTIG ET ROTHENBERG¹⁰, l'ATP a été préparé à partir de muscle de lapin selon DOUNCE, ROTHSTEIN, BEYER, MEIER ET FREER¹¹.

Les cétooses sont dosés par la technique décrite par ROE, EPSTEIN ET NORMAN pour l'inuline¹²; les aldoses par la méthode de NELSON¹³; le phosphore inorganique par la méthode de FISKE ET SUBBAROW¹⁴; le phosphore total selon LEPAGE¹⁵; l'azote total par la méthode de KJELDAHL.

Tous les fractionnements de protéines sont réalisés en chambre froide ($+ 2^\circ$). Le sulfate ammonique est ajouté sous forme d'une solution qui est saturée à cette température. Le pH des extraits est mesuré à l'électrode de verre. La séparation des fractions dans le sulfate ammonique se fait par centrifugation, 1 à 2 heures après addition du sel neutre. Toutes les fractions sont dialysées, d'abord contre NaHCO_3 0.04% pendant au moins 12 heures, puis contre de l'eau distillée.

RÉSULTATS

1. Purification de la fructokinase de foie de boeuf

1. 1 kg de foie de boeuf est homogénéisé au Waring Blendor dans 3 volumes d'eau distillée froide. L'homogénéisat maintenu à 0°C , est porté à pH 4.5 (10 à 20 ml d'HCl 5 N sont nécessaires pour cette opération) et ramené aussitôt à pH 5.5 avec NaOH 2.5 N. Le volumineux précipité est éliminé par centrifugation; il contient la totalité des composants particuliers qui sont irréversiblement agglutinés à partir de pH 5.5 et une grande quantité de protéines qui, dénaturées à pH 4.5 sont insolubilisées à pH 5.5.

2. Le liquide clair recueilli après centrifugation est porté à pH 7.5 et fractionné au sulfate ammonique. La fraction qui précipite entre 40 et 60 % de saturation est recueillie, suspendue dans un minimum d'eau et dialysée.

3. La préparation dialysée est portée successivement à pH 6.5, 5.7 et 5.2. Les précipités isoélectriques qui se forment dans ces conditions sont écartés par centrifugation.

L'ensemble des opérations réalisées jusqu'ici ne provoque aucune dénaturation de la fructokinase, les pertes étant uniquement dues au grand volume des précipités qui sont écartés.

4. La purification ultérieure est réalisée par deux fractionnements au sulfate ammonique, l'un à pH 4.6 (tampon acétate 0.1 M) entre 35 et 50% de saturation, l'autre à pH 6.5 (tampon cacodylate 0.1 M) entre 42 et 55% de saturation.

Le traitement à pH 4.6 est réalisé en un minimum de temps; les centrifugations sont faites aussitôt après l'addition de sulfate ammonique. Le précipité est redissous dans une solution diluée de bicarbonate de façon à ramener le pH à des valeurs comprises entre 6 et 7. Malgré ces précautions, on perd facilement 40 à 50% de l'enzyme au cours de cette étape.

Le Tableau I donne les résultats d'un fractionnement réalisé de la sorte. L'activité de l'homogénéisat initial ne peut être connue avec précision à cause de la présence de phosphatases et est supposée égale à celle d'une préparation débarrassée de composants particuliers par une centrifugation à $20,000 \times g$ pendant 90 minutes. L'activité de chaque fraction a été mesurée après une dilution telle que toutes les activités soient approximativement égales.

Sauf indication contraire, toutes les expériences décrites plus loin ont été réalisées avec une préparation ayant subi toutes les étapes décrites ci-dessus.

TABLEAU I
PURIFICATION DE LA FRUCTOKINASE DE FOIE DE BOEUF

Préparation	mg d'azote par ml	μg de fructose estérifié en 20 min	
		par 1 ml	par 1 mg d'azote
Homogénéisat	7.3	486	66.5
Après centrifugation à pH 5.5	2.14	518	242
Après (NH ₄) ₂ SO ₄ à pH 7.5	5.8	4160	720
Après (NH ₄) ₂ SO ₄ à pH 4.6	5.25	6660	1270
Après (NH ₄) ₂ SO ₄ à pH 6.5	4.55	6750	1485

2. Spécificité de l'enzyme

La distinction entre la fructokinase et la glucokinase de foie peut être réalisée facilement avec des préparations non purifiées grâce à la sensibilité inverse des deux activités envers l'ion K⁺. Ainsi que nous l'exposerons en détail plus loin, la fructokinase est fortement activée par le chlorure ou l'acétate de potassium molaire; inversement la glucokinase est inhibée dans les mêmes conditions.

TABLEAU II
SENSIBILITÉS INVERSES DE LA FRUCTOKINASE
ET DE LA GLUCOKINASE VIS-A-VIS DE KCl MOLAIRE

Hexose présent	μg d'hexose estérifié en 35 minutes	
	sans KCl	+ KCl
Glucose	215	30
Fructose	210	622

Homogénéisat de foie de cobaye, centrifugé 90 min à 20,000 × g. Décantat dialysé 12 h. Fluorure présent.

Tant en l'absence qu'en présence de K⁺ M, la fructokinase purifiée est totalement inactive vis-à-vis du glucose, du mannose et du galactose et elle n'est pas inhibée par ces sucres lorsqu'on les ajoute à concentration double de celle du fructose. L'activité vis-à-vis du fructose-6-phosphate, mesurée manométriquement, est également nulle.

Le sorbose par contre est phosphorylé à peu près à la même vitesse que le fructose et cette phosphorylation est activée par KCl M.

Utilisant la méthode manométrique, nous avons constaté de plus que des modifications de la concentration en fructose entre 10⁻³ et 2 · 10⁻² M n'influencent pas la vitesse initiale de la réaction, aussi bien en présence qu'en l'absence de chlorure de potassium molaire. L'affinité de l'enzyme pour le fructose est donc très grande et la constante de

MICHAELIS est trop petite pour être déterminée avec la technique que nous utilisons; elle est certainement inférieure à $5 \cdot 10^{-4} M$.

TABLEAU III
ACTIVITÉ DE 2 PRÉPARATIONS DE FRUCTOKINASE PURIFIÉE SUR LE SORBOSE

Hexose présent	μg d'hexose estérifié en 30 min	
	sans KCl	+ KCl M
Fructose	140	453
Sorbose	140	336
Fructose	160	432
Sorbose	150	305

3. Effet du p_H

Comme le montre la Fig. 1, des modifications de p_H allant de 5.5 à 7.8 n'influencent pas l'activité de la fructokinase. Il convient de noter que cette zone correspond à la zone de stabilité maxima du ferment.

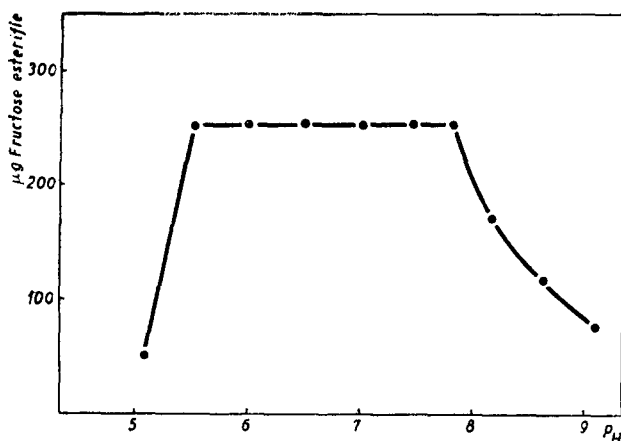


Fig. 1. Influence du p_H sur l'activité de la fructokinase. Tampon ABC $4 \cdot 10^{-2} M$ + acétate de potassium $3.75 \cdot 10^{-1} M$, ajusté avec HCl

4. Effet du fluorure

L'effet du fluorure est très différent selon l'ordre dans lequel on mélange les réactifs. Il ne provoque aucune inhibition et est plutôt légèrement activateur lorsqu'on réalise le mélange NaF-MgCl₂ en présence d'ATP; par contre, si l'ATP est ajouté après que ce mélange a été réalisé, il se produit une inhibition d'au moins 50%, tant de la fructokinase que de la glucokinase du foie. Cette inhibition est vraisemblablement due à l'insolubilisation de MgF₂, tandis qu'en présence d'ATP il se formerait un ion complexe ATP-Mg-F. Ce complexe est peu soluble et forme un précipité floconneux qui se redissout lorsque le volume du mélange est complété.

Bibliographie p. 423.

5. Effet des ions magnésium et potassium

La fructokinase hépatique est inactive en l'absence d'ions Mg^{++} ou Mn^{++} . Elle est de plus fortement activée par l'ion K^+ . La Fig. 2 montre l'augmentation d'activité, tant de la fructokinase purifiée que d'une préparation brute, en présence de doses croissantes de chlorure ou d'acétate de potassium; dans les deux cas l'activité optima est atteinte en présence de $K^+ M$.

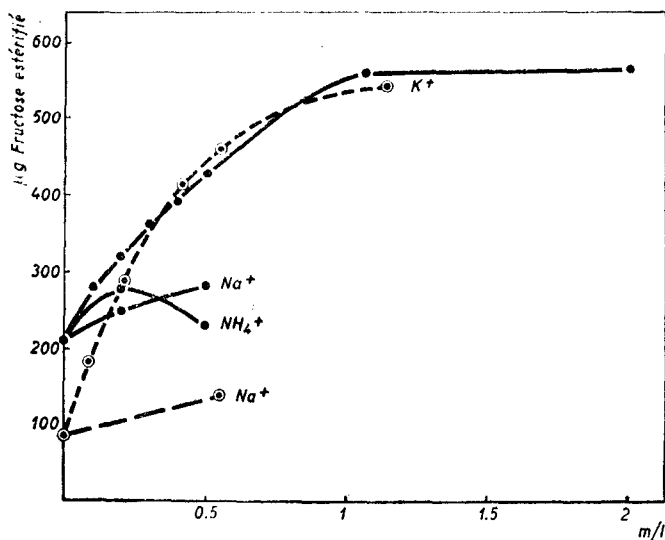


Fig. 2. Activation de la fructokinase par des doses croissantes d'ions K^+ ou Na^+ . Trait plein: fructokinase purifiée + acétate de Na^+ , K^+ ou NH_4^+ . Trait interrompu: foie de lapin, centrifugé à haute vitesse, dialysé, + chlorure de Na^+ ou K^+ , fluorure présent

Le degré d'activation par une telle dose de K^+ est le plus souvent de 3 à 4 fois. L'effet de Na^+ est beaucoup moins important. L'ion NH_4^+ , activateur à faible concentration, devient rapidement inhibiteur.

6. Etude du produit de la réaction

Au cours de la réaction fructokinase on ne constate guère de diminution appréciable du phosphore acido-labile présent; l'ester phosphorique formé est donc aussi rapidement hydrolysé en milieu acide que l'ATP et n'est ni du fructose-6-phosphate ni du fructose 1-6-diphosphate.

Cet ester est soluble dans l'eau en présence d'ions Ca^{++} , Ba^{++} et Hg^{++} ; le sel de plomb précipite mais cette propriété est de peu d'utilité pour l'isolement de l'ester car elle est commune à l'ATP et à l'ADP dont il doit être séparé et le fructose non estérifié lui-même est entraîné par adsorption. Le sel de baryum peut être précipité par addition de deux volumes d'alcool méthylique; cette précipitation se fait le mieux à chaud et en présence d'un léger excès de baryum.

Ces propriétés ont été mises à profit pour isoler le produit de la réaction: Après incubation de l'enzyme purifié avec des quantités suffisantes de substrats, la réaction est terminée par addition d'acétate mercurique (solution à 20% dans l'acide acétique

0.3 N) et de chlorure de magnésium* en quantité suffisante pour que la précipitation des nucléotides soit complète. Ceux-ci sont éliminés par centrifugation, le liquide surnageant est alcalinisé avec KOH 5 N et les oxydes de mercure sont écartés. La solution est additionnée de deux volumes d'alcool méthylique et recentrifugée. On ajoute ensuite la quantité minima d'acétate de baryum pour obtenir la précipitation de l'ester.

Les résultats de l'analyse de deux préparations de fructose-phosphate sont représentés au Tableau IV et comparés aux valeurs publiées par TANKO ET ROBISON¹⁶ pour le fructose-1-phosphate.

TABLEAU IV
ETUDE DU PRODUIT DE LA RÉACTION FRUCTOKINASIQUE

		Préparation I	Préparation II	Fructose-1-phosphate selon TANKO ET ROBISON ¹⁶
<i>Rapport</i> Fructose/Phosphore (M/M)		I	I	I
<i>Valeur de fructose</i> (ROE <i>et al.</i>) (en % du fructose total) (NELSON)		84 67.6	91 —	
<i>Hydrolyse acide</i> dans HCl N à 100° en % du P total	Temps en minutes			
	5	50	46.5	55.7
	10	77	75	80.7
	15	88.6	88.2	88.8
	25	99	99.5	98.5
	40	100	100	100
<i>Hydrolyse alcaline</i> dans réactif A de NELSON à 100° en % du P total	Temps en minutes			
	7 20	50 93		
<i>Pouvoir rotatoire spécifique</i> (acide libre)		$[\alpha]_D^{17} = -44.4$ (C = 1.4%)	$[\alpha]_D^{17} = -45$ (C = 1.87%)	$[\alpha]_{5461}^{20} = -64.2$ (C = 11.3%)

Le produit de phosphorylation du sorbose a été isolé d'une manière analogue et son hydrolyse en milieu acide a été étudiée (Tableau V).

TABLEAU V
HYDROLYSE ACIDE DU PRODUIT DE PHOSPHORYLATION DU SORBOSE

Minutes dans HCl N à 100°	5	10	15	25	40
P hydrolysé en % du P total	54.5	76.5	85.1	100	100

* L'ATP et l'ADP sont solubles dans l'eau en présence d'ions mercuriques; ils ne précipitent qu'après addition d'une quantité suffisante d'ions bivalents (Mg⁺⁺, Ba⁺⁺, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺).

Bibliographie p. 423.

DISCUSSION

1. Les résultats décrits dans ce travail montrent qu'on peut extraire du foie un enzyme capable de phosphoryler le fructose et le sorbose et inactif vis-à-vis du glucose, du galactose et du mannose. L'appellation de cétohexokinase proposée par LEUTHARDT ET TESTA⁴ paraît donc justifiée, d'autant plus que ces auteurs ont également observé une phosphorylation du tagatose. SLEIN, CORI ET CORI¹ ont décrit déjà une fructokinase dans le muscle. La non-identité des deux enzymes est cependant prouvée par le fait que la fructokinase du muscle ne peut être saturée en fructose¹ tandis que cette saturation est très rapidement atteinte dans le cas de l'enzyme hépatique. Il a été également démontré que l'enzyme étudié ne phosphoryle pas le fructose-6-phosphate en fructose-1-6-diphosphate.

2. Le produit de la réaction fructokinasique peut être identifié à celui qui a été décrit par TANKO ET ROBISON¹⁶ comme étant du fructose-1-phosphate. Il s'hydrolyse en effet à la même vitesse dans HCl N à 100° et il est fortement lévogyre. Le pouvoir rotatoire spécifique est plus petit d'environ 25% que celui de l'ester de TANKO ET ROBISON, ce qui peut cependant s'expliquer par la dilution plus grande des solutions que nous avons utilisées et par la différence de longueur d'onde employée.

Les valeurs de fructose obtenues au résorcinol (ROE *et al.*) et au cuivre (NELSON) sont sans signification car l'ester est rapidement hydrolysé dans les conditions de ces deux dosages, qui se font en milieu très acide ou très alcalin.

Le fructose-1-phosphate a été extrait du foie de chien et de lapin par PANY¹⁷; KJERULF-JENSEN¹⁸ a trouvé une accumulation de cet ester dans le foie de lapin et de rat pendant la résorption alimentaire de fructose, tandis que OCHOA, CORI ET CORI¹⁹ ont signalé la formation de fructose-1-phosphate au cours de la phosphorylation aérobie du fructose par des homogénéisats de foie. Ces différents faits démontrent que l'enzyme étudié intervient effectivement dans le métabolisme du fructose.

Le produit de phosphorylation du sorbose est également un ester relativement labile en milieu acide. On peut supposer, par analogie, qu'il s'agit du sorbose-1-phosphate.

3. Le rôle du magnésium et du potassium fait l'objet de la publication suivante.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par un subside des "Lilly Research Laboratories". Nous remercions le professeur CHR. DE DUVE des conseils qu'il nous a donnés au cours de l'exécution de ce travail. Nous sommes reconnaissant à Monsieur L. EYCKMANS pour l'aide technique qu'il nous a apportée.

RÉSUMÉ

1. On a purifié à partir de foie de bœuf un enzyme qui catalyse la phosphorylation du fructose et du sorbose aux dépens de l'ATP, mais qui est inactif vis-à-vis des aldohexoses et du fructose-6-phosphate.

2. Le produit de la réaction fructokinasique a été isolé et identifié à l'ester de TANKO ET ROBISON (fructose-1-phosphate). Le produit de phosphorylation du sorbose est probablement le sorbose-1-phosphate.

3. L'enzyme est inactif en l'absence de magnésium ou de manganèse et est fortement activé

par l'acétate ou le chlorure de potassium molaire. Entre 5.5 et 7.8, le pH est sans influence sur la vitesse de la réaction. L'affinité de l'enzyme pour le fructose est très grande, la constante de MICHAELIS étant certainement inférieure à $5 \cdot 10^{-4} M$.

SUMMARY

1. An enzyme, catalyzing the phosphorylation of fructose and sorbose with the aid of ATP, and inactive towards aldohexoses, has been purified from beef-liver.

2. The product of the fructokinase reaction has been isolated and identified with the TANKO-ROBISON ester (fructose-1-phosphate). It is probable that sorbose-1-phosphate is formed when sorbose is phosphorylated by the enzyme.

3. The enzyme is inactive in the absence of magnesium or manganese and is strongly activated by molar potassium acetate or chloride. Between 5.5 and 7.8, the pH does not influence the rate of the reaction. The affinity of the enzyme for fructose is very large, the MICHAELIS constant being certainly lower than $5 \cdot 10^{-4} M$.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Ein Ferment, welches die Phosphorylierung der Fruktose und der Sorbose mittels ATP katalysiert, wurde aus Rinderleber angereichert; dieses Ferment ist inaktiv gegen Aldohexosen und Fruktose-6-phosphat.

2. Das Produkt der Fruktokinase-Reaktion wurde isoliert und als TANKO-ROBISON-Ester (Fruktose-1-phosphat) identifiziert. Es ist wahrscheinlich, dass Sorbose-1-phosphat gebildet wird, wenn Sorbose durch das Enzym phosphoryliert wird.

3. Das Enzym ist inaktiv in Abwesenheit von Magnesium oder Mangan und wird stark durch molares Kaliumacetat oder -chlorid aktiviert. Zwischen 5.5 und 7.8 beeinflusst das pH die Reaktionsgeschwindigkeit nicht. Die Affinität des Enzyms zu Fruktose ist sehr gross; die Konstante vom MICHAELIS ist gewiss geringer als $5 \cdot 10^{-4} M$.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. W. SLEIN, G. T. CORI ET C. F. CORI, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 763.
- ² C. S. VESTLING, A. K. MYLROIE, U. IRISH ET N. H. GRANT, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 789.
- ³ F. LEUTHARDT ET E. TESTA, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1919.
- ⁴ F. LEUTHARDT ET E. TESTA, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 8 (1950) C 67.
- ⁵ H. G. HERS, J. BERTHET, L. BERTHET ET CHR. DE DUVE, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 21.
- ⁶ M. PLUMEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 30 (1948) 129.
- ⁷ CHR. DE DUVE, J. BERTHET, H. G. HERS ET L. DUPRET, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 1242.
- ⁸ T. E. WEICHELBAUM ET M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 5.
- ⁹ S. P. COLOWICK ET H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 148 (1943) 117.
- ¹⁰ C. NEUBERG, H. LUSTIG ET M. A. ROTHENBERG, *Arch. Biochem.*, 3 (1943) 33.
- ¹¹ A. DOUNCE, A. ROTHSTEIN, G. T. BEYER, R. MEIER ET R. M. FREER, *J. Biol. Chem.*, 174 (1948) 361.
- ¹² J. H. ROE, J. H. EPSTEIN ET P. G. NORMAN, *J. Biol. Chem.*, 178 (1949) 839.
- ¹³ N. NELSON, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 375.
- ¹⁴ C. H. FISKE ET Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.*, 66 (1925) 375.
- ¹⁵ G. A. LEPAGE, in W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS ET J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*. Burgess Publishing Co., Minneapolis (1949).
- ¹⁶ B. TANKO ET R. ROBISON, *Biochem. J.*, 29 (1935) 961.
- ¹⁷ J. PANY, *Z. physiol. Chem.*, 272 (1942) 273.
- ¹⁸ K. KJERULF JENSEN, *Acta Physiol. Scand.*, 4 (1942) 249.
- ¹⁹ S. OCHOA, G. T. CORI ET C. F. CORI, in C. F. CORI, *Biol. Symposia*, 5 (1941) 131.

Reçu le 9 Mai 1951